

## **BAB IV**

### **HASIL DAN PEMBAHASAN**

#### **A. Pembuatan Suspensi Bakteri Uji**

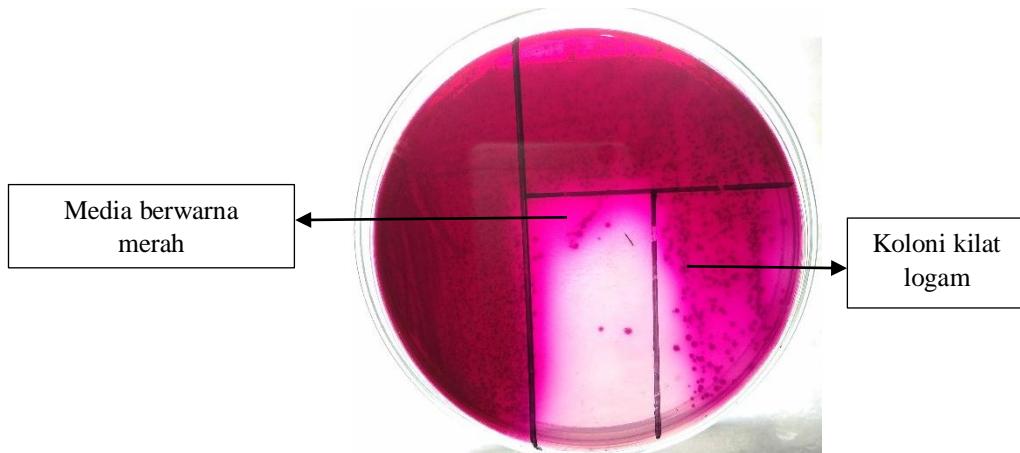
Suspensi dibuat berdasarkan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2017) untuk uji aktivitas antibakteri yang distandardkan dengan larutan Mc Farland 0,5. Standar Mc Farland adalah penyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan BaCl<sub>2</sub> 1% dan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%, kekeruhan Mc Farland digunakan untuk memperkirakan kepadatan sel bakteri yang akan digunakan sebagai pengujian antibakteri. Larutan standar Mc Farland 0,5 ekuivalen dengan suspensi sel dengan konsentrasi 1,5 x 10<sup>8</sup> cfu/ml (Andrews 2008). Konsentrasi suspensi yang digunakan semakin kecil maka akan semakin besar nilai daya aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Pembuatan suspensi bertujuan untuk standarisasi atau pengendalian jumlah bakteri. Hasil gambar dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### **B. Hasil Identifikasi Bakteri Uji dan Isolat Bakteri Endofit**

Identifikasi bakteri uji dan isolat bakteri endofit untuk mengetahui dan menentukan ciri-ciri bakteri yang akan digunakan untuk uji aktivitas antibakteri dan memastikan bahwa bakteri yang digunakan benar-benar murni tanpa adanya kontaminasi. Identifikasi dilakukan dengan : (1) uji morfologi; (2) pewarnaan gram dan (3) pewarnaan spora.

##### **1. Uji Morfologi**

Identifikasi bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922, biakan *Escherichia coli* diinokulasikan pada media EA (*Endo agar*) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penampakan koloni bakteri *Escherichia coli* pada media EA akan menghasilkan warna merah dengan kilat logam yang permanen (Volk & Wheller 1988). Media EA mengandung laktosa dimana bakteri *Escherichia coli* mampu memfermentasikan laktosa yang terurai menjadi aldehid dan asam. Aldehid akan memecah antara ikatan fuschin (cat) dengan natrium sulfit menjadi fushin. Fushin memberikan warna kilat logam pada koloni.



**Gambar 9. Identifikasi morfologi *Escherichia coli* ATCC 25922**

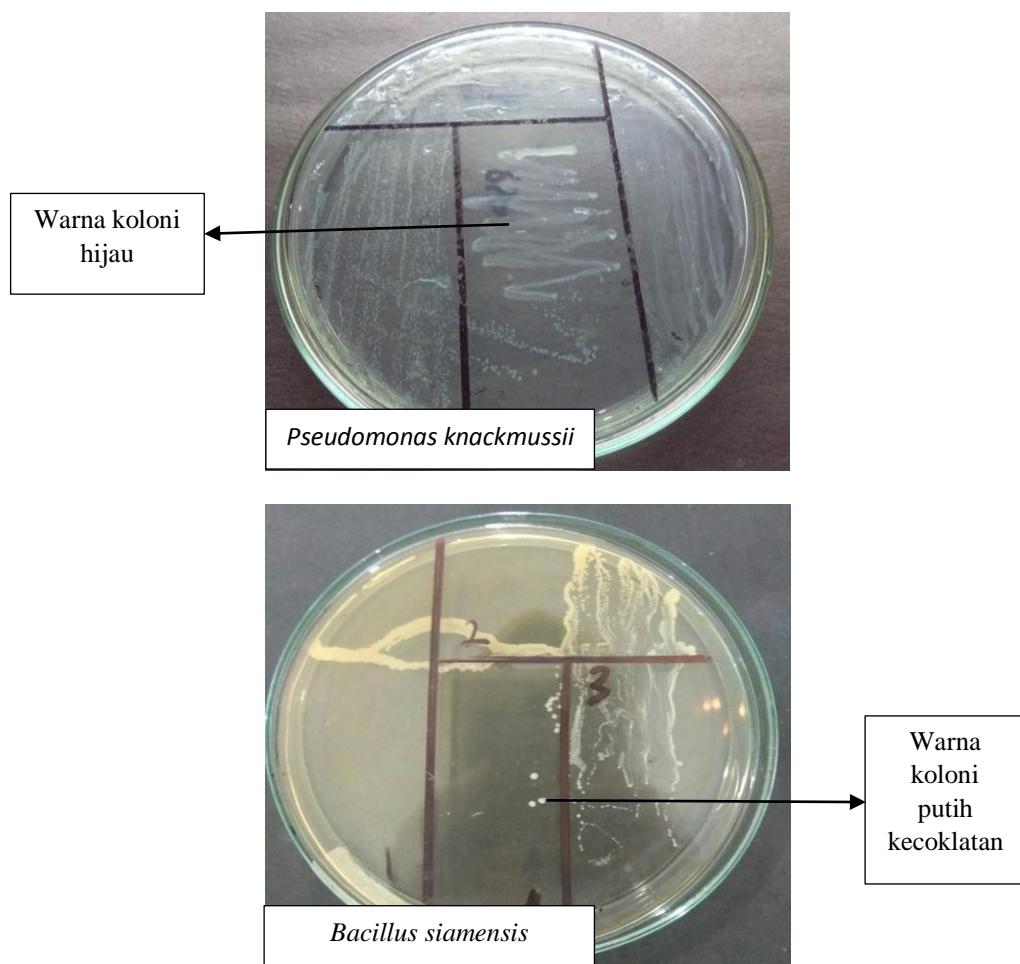
Identifikasi isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* diinokulasikan pada media PSA (*Pseudomonas Selektive Agar*) dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* diinokulasikan pada media NA (*Nutrien Agar*), masing-masing diinkubasikan selama 24 jam pada suhu 37°C. Penampakan koloni yang terjadi yaitu isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* dilakukan pengamatan pada pertumbuhan, bentuk, permukaan, elevasi dan bentuk tepi koloni (Jutono *et al.* 1980).

**Tabel 1. Identifikasi isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis***

Morfologi koloni yang diamati	Isolat bakteri endofit <i>Pseudomonas knackmussii</i>	Isolat bakteri endofit <i>Bacillus siamensis</i>
Media	PSA	NA
Warna koloni	Hijau	Putih kecoklatan
Bentuk koloni	Bulat kecil	Bulat besar
Permukaan	Mengkilap	Kasar
Elevasi	Cembung	Cembung
Bentuk tepi	Rata	Rata

Berdasarkan pengamatan isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* pada media PSA membentuk pigmen pioverdin yaitu koloni bakteri membentuk warna hijau dan berbentuk bulat kecil, permukaan mengkilap, elevasi cembung dan bentuk tepi rata. Literatur menyatakan bahwa *Pseudomonas* membentuk pigmen pioverdin yaitu koloni bakteri akan menghasilkan warna kehijau-hijuan, berflouresensi, larut dalam air dan tidak larut dalam kloroform hal tersebut disebabkan karena adanya magnesium klorida dan kalium sulfat yang terkandung dalam media PSA (Sulviana *et al.* 2017). Sedangkan pada hasil isolat bakteri

endofit *Bacillus siamensis* yaitu koloni bakteri berwarna putih kecoklatan, berbentuk bulat dan besar, permukaan kasar, elevasi cembung dan bentuk tepi rata. Berdasarkan penelitian Mukamto (2015) menyatakan bahwa karakteristik *Bacillus sp* pada media NA bermacam-macam namun pada umumnya koloni akan menghasilkan warna putih sampai kekuningan, tepi rata, permukaan kasar, tidak berlendir bahkan ada cenderung kering bubuk, koloni besar dan tidak mengkilat.

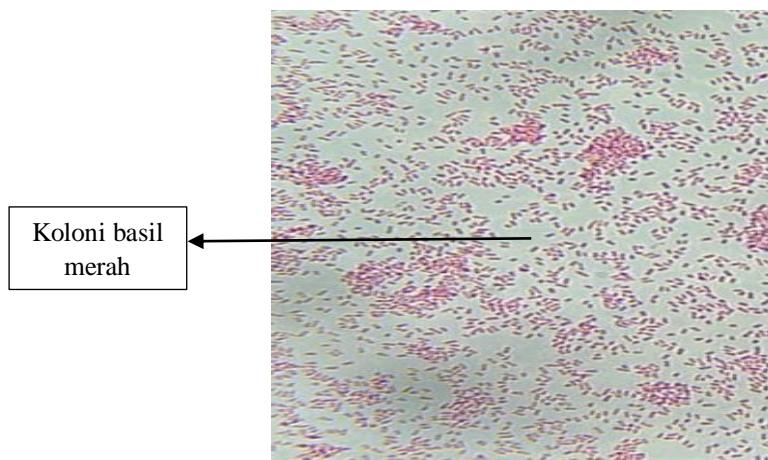


**Gambar 10. Identifikasi morfologi isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis***

## 2. Pewarnaan Gram

Pewarnaan Gram digunakan untuk membedakan bakteri yang bersifat Gram positif dan Gram negatif. Pewarnaan Gram ini dilakukan melalui 4 tahapan yaitu pemberian cat utama (kristal violet), pengintensifan cat utama dengan

menambahkan larutan lugol, pencucian dengan larutan peluntur (alkohol) dan pemberian cat penutup (safranin) (Pelczar & Chan 1986).

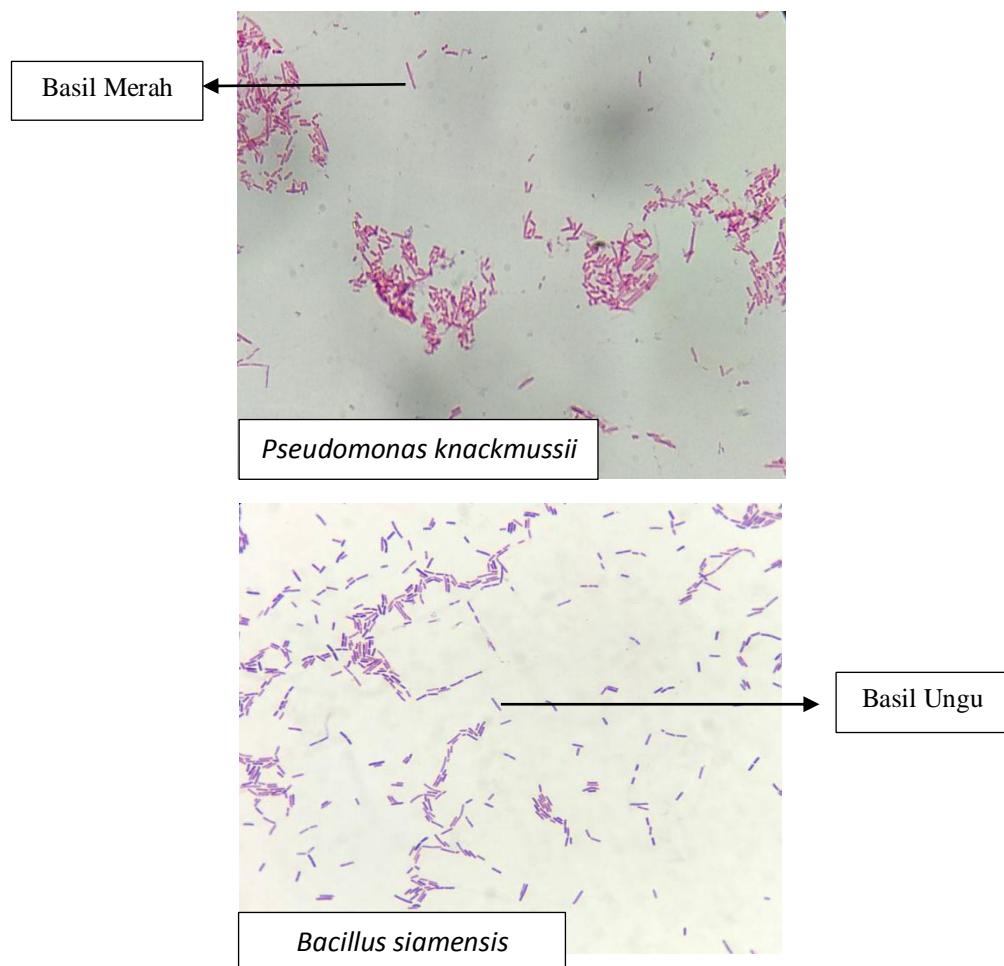


**Gambar 11. Pewarnaan Gram *Escherichia coli* ATCC 25922.**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk pemastian bakteri uji *Escherichia coli* ATCC 25922 termasuk golongan bakteri Gram negatif. Prinsip pewarnaan Gram negatif adalah bakteri akan berikatan dengan pewarna akhir yang diberikan pada pengujian. Bakteri *Escherichia coli* diperoleh hasil sel bakteri berwarna merah, bentuk batang. Pewarnaan Gram A (kristal violet) diteteskan sehingga menyebabkan kristal violet akan mewarnai seluruh permukaan sel bakteri. Penambahan Gram B (lugol) menyebabkan terbentuknya kompleks kristal violet-lugol yang akan meningkatkan afinitas zat warna oleh sel bakteri, seluruh bakteri akan berwarna ungu. Penambahan Gram C (alkohol) menyebabkan terbentuknya pori-pori pada Gram negatif yang memiliki banyak lapisan lemak (lipid larut dalam etanol), sehingga kompleks kristal violet-lugol tidak menempel pada dinding sel bakteri sehingga menyebabkan sel Gram negatif akan kehilangan warna ungunya. Penambahan Gram D (safranin) menyebabkan sel bakteri Gram negatif akan menyerap zat pewarna menjadi warna merah (Leboffe & Burton 2011).

**Tabel 2. Identifikasi pewarnaan Gram isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis***

Isolat	Morfologi		Gram
	Bentuk	Warna	
Isolat Bakteri Endofit <i>Pseudomonas knackmussii</i>	Basil	Merah	Negatif
Isolat Bakteri Endofit <i>Bacillus siamensis</i>	Basil	Ungu	Positif



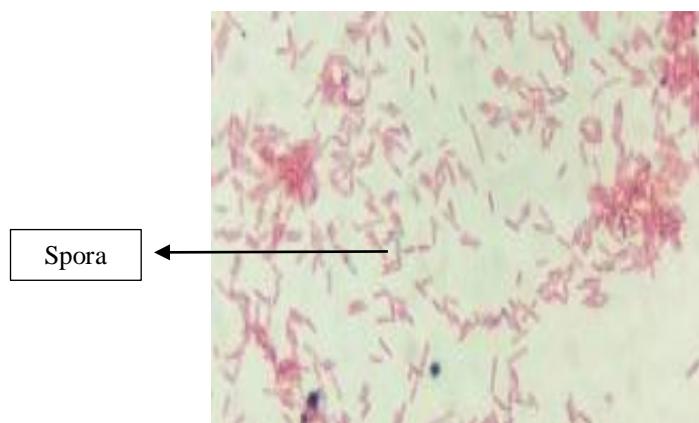
**Gambar 12. Pewarnaan Gram isolat bakteri endofit**

***Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis***

Pewarnaan Gram yang dilakukan menunjukkan penampakan sel isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* adalah Gram negatif berbentuk basil dan berwarna merah. Pewarnaan dihasilkan warna merah karena tidak mampu menahan kompleks zat warna kristal violet dan lugol ketika diberikan larutan peluntur akan mengalami pelunturan sehingga mampu diwarnai dengan safranin. Sedangkan pewarnaan Gram pada isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* menunjukkan penampakan sel bakteri Gram positif berbentuk basil berderet dan menyebar berwarna ungu. Pewarnaan dihasilkan warna ungu karena bakteri memiliki afinitas dinding sel terhadap kristal violet sehingga tidak akan terlarut ketika diberikan larutan peluntur dan tidak mampu diwarnai oleh safranin (Jawetz *et al.* 2012).

### 3. Pewarnaan spora

Spora dibentuk oleh jenis bakteri tertentu terutama genus *bacillus* dan *clostridium*, struktur yang khas bagi bakteri ini ialah endospora. Letak endospora ada tiga yaitu sentral, subterminal, dan terminal (Pelczar & Chan 1986). Maka pewarnaan spora dilakukan pada isolat bakteri endofit Gram positif yaitu isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis*. Spora adalah bentuk bakteri dalam mempertahankan diri dari pengaruh lingkungan luar. Spora akan lebih tahan lama dalam keadaan yang ekstrim misalnya keadaan kering, panas atau adanya pengaruh bahan kimia yang beracun. Dinding spora bersifat impermeabel, namun zat warna mampu diserap dengan cara memanaskan preparat. Pemanasan menyebabkan lapisan spora mengembang dan zat warna masuk (Lay 1994). Spora yang diwarnai akan sulit melepaskan zat warna yang diserap dan tidak mampu mengikat zat warna yang diberikan berikutnya. Hal ini dikarenakan spora memiliki selubung yang keras dan tebal. Pewarnaan spora digunakan zat pewarna *malachite green* yang diikat oleh spora bakteri setelah pencucian dengan larutan safranin. Spora akan berwarna hijau dan sel vegetatif akan berwarna merah (Agustina *et al* 2013). Pewarnaan spora yang dilakukan menunjukkan penampakan sel isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* memiliki spora subterminal



**Gambar 13. Pewarnaan spora isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis***

Berdasarkan pewarnaan spora pada isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* diperoleh sel bakteri yang memiliki spora berwarna hijau, hal tersebut

sesuai dengan penelitian sebelumnya Wulandari & Desi (2018) yang menyatakan bahwa isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* memiliki spora.

### C. Hasil Uji Biokimia Bakteri Uji dan Isolat Bakteri Endofit

Uji biokimia bakteri merupakan suatu cara untuk mengidentifikasi suatu biakan bakteri hasil isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Bakteri ditanam dalam media *Sulfida Indol Motility* (SIM), *Klinger Iron Agar* (KIA), *Lysine Iron Agar* (LIA), dan *Simmon Citrat*. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

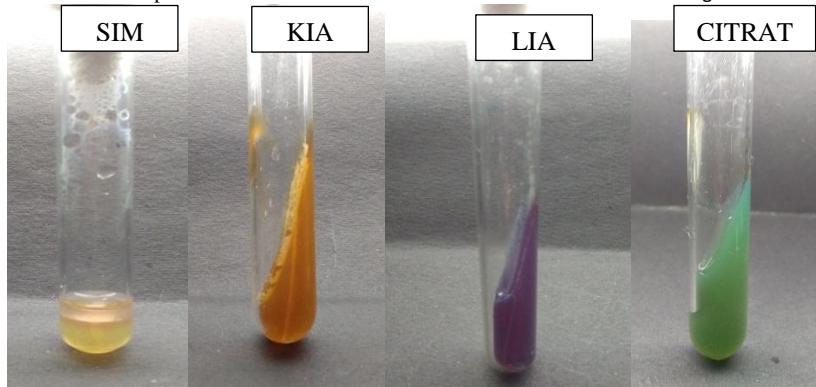
**Tabel 3. Identifikasi uji biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922**

Pengujian	Hasil	Pustaka
SIM	-++	-++
KIA	A/AG S(-)	A/AG S(-)
LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
Citrat	-	-

Keterangan:

SIM : Sulfida Indol Mortility  
 KIA : Kligers Iron Agar  
 K : Ungu (LIA)  
 S : Sulfid (Hitam)  
 + : Reaksi positif

A : Kuning  
 K : Merah (KIA)  
 LIA : Lysin Iron Agar  
 G : Gas  
 - : Reaksi negatif



**Gambar 14. Uji biokimia *Escherichia coli* ATCC 25922**

Pengujian pada media SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Hasil pengujian *Escherichia coli* ATCC 25922 pada media SIM menunjukkan hasil (-++) ini artinya bakteri tidak mampu menghidrolisis triptopan menjadi asam piruvat dan tidak menghasilkan hydrogen sulfida yang menyebabkan media tidak berwarna hitam. Penambahan Erlich A dan B yang mengandung *dimethylaminobenzaldehyde* (DMABA) dan HCl akan bereaksi dengan indol menghasilkan quinoidal yang mengubah lapisan menjadi warna merah muda, hal ini menandakan bahwa *Escherichia coli* ATCC 25922 positif

indol dan keberadaan triptofanase. Uji motilitas positif dengan adanya pertumbuhan disekitar area penusukan berwarna putih, hal ini terjadi karena adanya pergerakan bakteri pada media untuk mempertahankan bentuknya (Cowan 2004).

Uji pada media KIA untuk mengetahui terjadinya fermentasi glukosa, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Media KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1% dan *phenol red* sebagai indikator. Hasil yang diperoleh yaitu A/AG S(-), hasil A/A artinya pada bagian lereng dan dasar media terjadi perubahan dari merah menjadi kuning hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 mampu memfermentasikan glukosa dan laktosa. Perubahan warna media menjadi kuning disebabkan oleh aktivitas fermentasi bakteri yang memecah asam amino menghasilkan NH<sub>3</sub> dan meningkatkan pH media menjadi asam akibat konsentrasi laktosa lebih tinggi dari glukosa dimana indikator pada media adalah *phenol red* (dalam suasana asam). Media KIA juga mengandung thiosulfat yang merupakan substrat penghasil H<sub>2</sub>S, bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menghasilkan S (-) karena tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak ada reaksi antara H<sub>2</sub>S dengan Fe<sup>2+</sup> (tidak terbentuk warna hitam). Gas diproduksi oleh fermentasi karbohidrat yang mengakibatkan media akan terangkat pada bagian bawah.

Media LIA untuk mengetahui deaminasi lisin dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan LIA menunjukkan hasil K/KS(-), hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwana ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media, S(-) artinya uji H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA (Lindquist 2010).

Media citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal. Pengujian citrat menunjukkan hasil negatif, hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon, bila trinatrium sitrat ini dapat diuraikan maka ammonium dihidrogenfosfat terurai dan melepaskan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sehingga menyebabkan media menjadi alkalis dan indikator BTB (*Bromo Thymol*

*Blue)* mengubah warna media dari hijau menjadi biru. Berdasarkan hasil pengamatan yang dilakukan menunjukkan bahwa bakteri uji yang digunakan adalah *Escherichia coli* ATCC 25922.

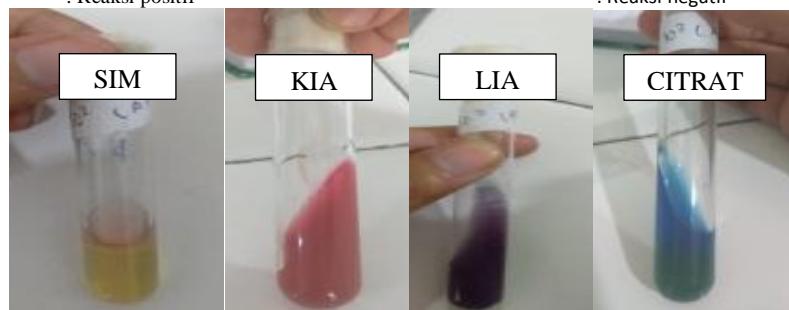
Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* secara biokimia dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Identifikasi uji biokimia isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis***

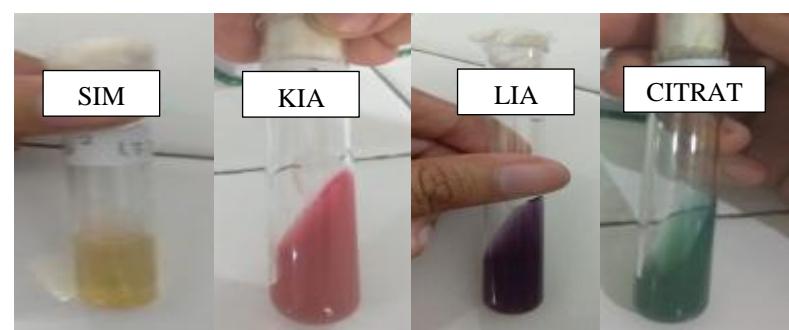
Isolat	Pengujian	Hasil	Pustaka (Wulandari & Desi 2018)
Isolat Bakteri Endofit <i>Pseudomonas knackmussii</i>	SIM	-++	-++
	KIA	K/K S(-)	K/K S(-)
	LIA	K/K S(-)	K/K S (-)
	Citrat	+	+
Isolat Bakteri Endofit <i>Bacillus siamensis</i>	SIM	- - -	- - -
	KIA	K/K S(-)	K/K S(-)
	LIA	K/K S(-)	K/K S(-)
	Citrat	-	-

Keterangan:

SIM	: Sulfida Indol Mortility	A	: Kuning
KIA	: Kligers Iron Agar	K	: Merah (KIA)
K	: Ungu (LIA)	LIA	: Lysin Iron Agar
S	: Sulfid (Hitam)	G	: Gas
+	: Reaksi positif	-	: Reaksi negatif



**Gambar 15. Uji biokimia isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii***



**Gambar 16. Uji biokimia isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis***

Hasil pengujian pada media SIM untuk mengetahui terbentuknya sulfida, indol dan motilitas. Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* menunjukkan hasil (-++) dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* menunjukkan hasil (- - -) artinya isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* tidak mampu mereduksi thiosulfat sehingga tidak menghasilkan hydrogen sulfida yang menyebabkan media tidak menghasilkan warna hitam. Penambahan Erlich A dan B yang mengandung *dimethylaminobenzaldehyde* (DMABA) dan HCl akan bereaksi dengan indol menghasilkan quinoidal yang mengubah lapisan menjadi warna merah muda pada permukaan media, isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* diketahui mampu menghasilkan triptopan dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* tidak mampu menghasilkan triptopan. Bakteri yang memiliki enzim triptopan menghidrolisis triptopan menjadi indol, piruvat dan amonia. Uji motilitas positif dengan adanya penyebaran pertumbuhan disekitar area penusukan berwarna putih, hal ini terjadi karena adanya pergerakan bakteri pada media untuk mempertahankan bentuknya, hasil menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* positif dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* negatif.

Uji pada media KIA untuk mengetahui terjadinya fermentasi glukosa, ada tidaknya gas dan pembentukan sulfida. Media KIA mengandung laktosa 1% dan glukosa 0,1% dan *phenol red* sebagai indikator. Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* menunjukkan hasil K/K S (-), hasil K/K artinya pada bagian lereng dan dasar media tidak terjadi perubahan dari merah menjadi kuning hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* tidak mampu memfermentasikan glukosa dan laktosa. Kandungan thiosulfat yang merupakan substrat penghasil  $H_2S$ , isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* tidak menghasilkan S (+) karena tidak mampu mendesulfurasi asam amino dan methion menjadi  $H_2S$  sehingga tidak ada reaksi antara  $H_2S$  dengan  $Fe^{2+}$  (tidak terbentuk warna hitam). Bakteri *Pseudomonas* tidak membentuk asam karena tidak mampu memfermentasikan glukosa dan laktosa serta tidak membentuk warna hitam (Harti 2015).

Media LIA untuk mengetahui deaminasi lisin dan pembentukan sulfida. Pengujian dengan LIA pada isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* menunjukkan hasil K/KS (-), hasil K/K artinya pada lereng dan dasar media berwana ungu, hal ini menunjukkan bahwa bakteri mendekarboksilasi lisin yang menyebabkan reaksi basa (warna ungu) diseluruh media, S (-) artinya uji H<sub>2</sub>S negatif ditunjukkan dengan tidak adanya warna hitam pada media LIA (Lindquist 2010).

Media citrat untuk mengetahui kemampuan bakteri menggunakan citrat sebagai sumber karbon tunggal yang ditandai dengan perubahan warna media menjadi biru. Pengujian citrat pada isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* menunjukkan hasil positif dan *Bacillus siamensis* menunjukkan hasil negatif. Hal ini menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* menggunakan citrat sebagai sumber karbon maka menyebabkan suasana menjadi basa sehingga terjadi peningkatan pH media di atas 7,6 karena trinatrium sitrat dapat diuraikan maka ammonium dihidrogen fosfat terurai dan melepaskan NH<sub>4</sub><sup>+</sup> sehingga menyebabkan media menjadi alkalis dan indikator BTB (*Bromo Thymol Blue*) mengubah warna media dari hijau menjadi biru (Sardiani *et al* 2015). Isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* tidak menggunakan citrat sebagai sumber karbon yang ditunjukkan dengan tidak adanya perubahan warna media menjadi biru.

#### D. Fermentasi Isolat Bakteri Endofit

Fermentasi dilakukan untuk memperbanyak jumlah sel bakteri endofit untuk memproduksi senyawa bioaktif lebih optimal. Proses ini menggunakan media cair yang akan lebih efektif untuk memproduksi biomassa dibandingkan menggunakan media fermentasi padat. Fermentasi isolat bakteri endofit menggunakan media BHI (*Brain-Heart Infusion*) sebanyak 80 mL dalam erlenmeyer, perlakuan dilakukan pada setiap isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis*. Inkubasi dilakukan selama 7 hari dengan suhu 37°C dan setiap hari dilakukan penggojogan selama 15 menit. Fermentasi dengan cara digojog merupakan metode pemanfaatan dari medium oleh mikroorganisme untuk hasil yang lebih efisien, mempercepat

pertumbuhan isolat bakteri dan pertumbuhan yang dihasilkan lebih homogen (Rante *et al.* 2013).

Senyawa bioaktif (metabolit sekunder) dihasilkan oleh mikroorganisme pada akhir fase stasioner pertumbuhan, hal ini karena metabolit sekunder biasanya akan disintesis pada akhir siklus pertumbuhan sel atau fase stasioner. Fase stasioner adalah kondisi dimana jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati (Pelczar & Chan 1986). Sintesis metabolit sekunder akan dihasilkan saat nutrisi pada media pertumbuhan mikroorganisme telah habis, keterbatasan jumlah nutrisi media pertumbuhan menyebabkan terakumulasinya metabolit sekunder dan terlepasnya gen-gen untuk sintesis metabolit sekunder (Pratiwi 2008).

Waktu 24 jam isolat bakteri masih berada dalam fase lag (penyesuaian diri) dan waktu 48 jam (2 hari) bakteri telah masuk ke fase logaritmik. Waktu fermentasi 48 jam isolat bakteri sudah berada pada fase akhir logaritmik dan mulai menghasilkan metabolit namun kandungan metabolitnya masih rendah (Khairani 2009). Menurut Wahyuningsih (2006) waktu optimal pertumbuhan bakteri adalah 96 jam, bakteri umumnya mencapai fase stasioner dan mulai menghasilkan metabolit sekunder. Fase stasioner pertumbuhan bakteri dapat terjadi pada waktu  $< 96$  jam ( $< 4$  hari) atau pada waktu  $> 96$  jam ( $> 4$  hari). Fase ini sel mikroorganisme lebih tahan terhadap keadaan ekstrem misalnya suhu yang lebih panas atau dingin, radiasi dan bahan-bahan kimia.

Penelitian Elita *et al.* (2013) menyatakan pertumbuhan bakteri endofit *Pseudomonas* diperoleh hasil kultur umur 72 jam (hari ke-3). Penelitian lainnya Roostan *et al.* (2012) menyatakan pertumbuhan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* diperoleh pada waktu 96 jam (hari ke-4). Begitu pula dengan penelitian El-Shestawy *et al.* (2014) menunjukkan kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus licheniformis* adalah pada waktu 72 jam (hari ke-3) dan Roostan *et al.* (2012) diketahui kurva pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis* adalah pada waktu 96 jam (hari ke-4). Hal tersebut menjadi pertimbangan dalam penentuan waktu fermentasi dimulai pada waktu 48 jam (hari ke-2) karena pada waktu 24 jam bakteri masih

berada dalam fase lag (penyesuaian diri) dan kemungkinan kandungan metabolit yang dihasilkan rendah.

Hasil fermentasi isolat kemudian disentrifugasi pada kecepatan 4000 rpm selama 60 menit untuk memisahkan antara supernatan dan biomassa. Supernatan dipisahkan dari biomassanya dan ditempatkan pada wadah vial untuk digunakan pada uji aktivitas antibakteri. Vial supernatan disimpan pada suhu dibawah 4°C, hal ini bertujuan menahan perubahan zat yang ada didalamnya. Pemisahan antara supernatan dan biomassa dilakukan karena mikroorganisme mampu mensekresikan senyawa bioaktif selama proses fermentasi ke luar sel yang terdapat pada filtrat biakan (Rante *et al.* 2013), maka setelah dilakukan sentrifugasi segera dipisahkan antara supernatan dan biomassanya, sehingga ketika digunakan untuk uji aktivitas antibakteri supernatan hanya mengandung senyawa bioaktif (metabolit sekunder) antibakteri dan meminimalkan kemungkinan sel bakteri endofit akan tumbuh diatas media. Hasil gambar fermentasi isolat bakteri endofit dapat dilihat pada lampiran 2.

#### E. Uji Aktivitas Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan pada isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* terhadap bakteri *Escherichia coli* ATCC 25922 menggunakan metode difusi cakram (*disc diffusion methods*) dan penentuan waktu fermentasi optimum terhadap aktivitas antibakteri terbesar yang ditunjukkan adanya daya hambat disekitar cakram dan diukur menggunakan jangka sorong. Metode difusi cakram (*disc diffusion methods*) memiliki keunggulan mampu dilakukan pengujian lebih banyak dalam satu kali kegiatan, tidak memerlukan tenaga yang banyak dan kertas cakram mampu menyerap senyawa antibakteri.

Pengujian aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit digunakan hasil fermentasi berupa supernatan hari ke-2 sampai hari ke-7, fermentasi hari ke-1 tidak dilakukan pengambilan supernatan karena selama waktu ± 24 jam bakteri baru melakukan penyesuaian diri dengan lingkungan untuk mulai membelah dan belum menghasilkan senyawa bioaktif. Supernatan hari ke-2 sampai hari ke-7

diserapkan pada kertas cakram steril sebanyak 30 $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet. Kontrol positif yang digunakan adalah antibiotik ciprofloxacin 5 $\mu$ g, sedangkan kontrol negatif yang digunakan adalah media BHI (*Brain-Heart Infusion*) steril sebanyak 30 $\mu$ L dengan menggunakan mikropipet. Antibiotik ciprofloxacin adalah antibiotik spektrum luas kelas fluoroquinolone, ciprofloxacin efektif melawan bakteri Gram negatif dan Gram positif dengan mekanisme menghambat proses replikasi *Deoksiribosa Nucleat Acid* (DNA). Ciprofloxacin bersifat bakterisidal (dapat membunuh bakteri) dan menghambat replikasi DNA dengan cara berikatan dengan enzim yang disebut DNA gyrase (tipe II topoisomerase) yang menyebabkan kerusakan pada kromosom bakteri (Sumampouw 2018). Kertas cakram yang telah direndam dengan supernatan hari ke-2 sampai hari ke-7 kemudian diletakkan diatas media agar yang telah diusap bakteri uji. Selanjutnya diinkubasi suhu 37°C selama 24 jam. Hasil pengukuran diameter zona hambat ditunjukkan pada tabel 5.

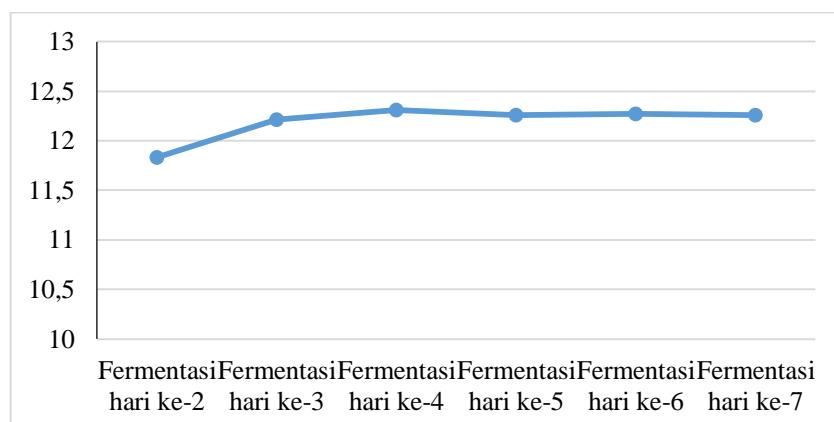
**Tabel 5. Hasil uji aktivitas antibakterit isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922**

Isolat bakteri endofit	Kelompok	Diameter hambat (mm)			Rata-rata (mm) ± SD
		I	II	III	
<i>Pseudomonas</i> <i>knackmussii</i>	Kontrol negatif (-)	0	0	0	0 ± 0
	Kontrol positif (+)	35,88	34,45	35,68	35,34 ± 0,14
	Fermentasi hari ke 2	11,35	11,16	12,99	11,83 ± 1,01
	Fermentasi hari ke 3	11,10	11,51	14,03	12,21 ± 1,59
	Fermentasi hari ke 4	12,45	12,20	12,29	12,31 ± 0,13
	Fermentasi hari ke 5	12,30	12,25	12,23	12,26 ± 0,04
	Fermentasi hari ke 6	12,44	12,33	12,05	12,27 ± 0,20
<i>Bacillus</i> <i>siamensis</i>	Fermentasi hari ke 7	12,25	12,43	12,10	12,26 ± 0,17
	Kontrol negatif (-)	0	0	0	0 ± 0
	Kontrol positif (+)	34,91	34,8	35,33	35,01 ± 0,81
	Fermentasi hari ke 2	9,46	9,15	9,60	9,40 ± 0,23
	Fermentasi hari ke 3	9,88	9,55	11,08	10,17 ± 0,23
	Fermentasi hari ke 4	10,49	10,5	11,34	10,78 ± 0,49
	Fermentasi hari ke 5	11,23	10,88	10,55	10,89 ± 0,34
	Fermentasi hari ke 6	10,33	10,2	11,25	10,59 ± 0,57
	Fermentasi hari ke 7	11,78	11,69	11,34	11,60 ± 0,23

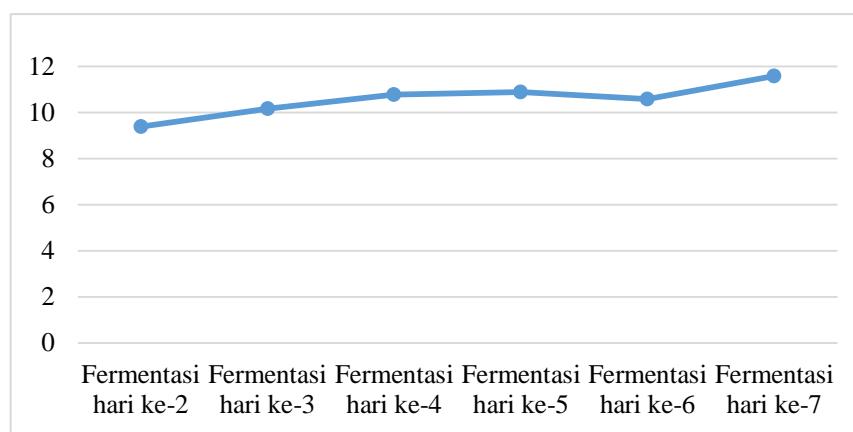
Keterangan :

- : Kontrol negatif (media steril *Brain-Heart Infusion*)
- + : Kontrol positif (antibiotik ciprofloxacin)

Hasil uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* pada isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* diketahui kontrol negatif tidak terdapat aktivitas antibakteri dan kontrol positif (antibiotik ciprofloxacin) memiliki kemampuan menghambat susceptible, menurut CLSI (2017) yaitu antibiotik ciprofloxacin cakram 5 µg memiliki rentan kemampuan menghambat susceptible > 21 mm, intermediet 16-20 mm dan resistan < 15 mm.



**Gambar 17. Kurva aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii***



**Gambar 18. Kurva aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis***

Berdasarkan hasil gambar 19 dan 20 kurva menunjukkan aktivitas antibakteri pada isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* lebih optimum pada fermentasi hari ke-2 rata-rata sebesar 11,83 mm dan isolat *Bacillus siamensis* lebih optimum pada hari ke-5 rata-rata sebesar 10,89 mm dibandingkan dengan fermentasi hari lainnya. Hasil ini sejalan dengan pernyataan Pelczar & Chan (1986), bahwa senyawa bioaktif (antibakteri) disintesis oleh mikroorganisme pada

akhir fase stasioner pertumbuhannya karena jumlah sel bakteri yang tumbuh sama dengan jumlah sel bakteri yang mati. Sintesis senyawa bioaktif dimulai pada saat beberapa nutrisi di dalam media pertumbuhan mikroorganisme telah habis. Keterbatasan nutrisi tersebut menyebabkan terakumulasinya senyawa bioaktif dan terlepasnya gen-gen untuk sintesis senyawa bioaktif (Pratiwi 2008).

Hasil penelitian ini berbeda dengan Roostan *et al.* (2012) dan Elita *et al.* (2013) yang menunjukkan fase stasioner dari kurva pertumbuhan bakteri *Pseudomonas* yaitu *Pseudomonas aeruginosa* pada kultur 96 jam (hari ke-4) dan *Pseudomonas stutzeri* serta *Pseudomonas cepacia* pada kultur 72 jam (hari ke-3) memiliki aktivitas terbesar terhadap *Escherichia coli*. Begitu pula dengan bakteri *Bacillus* yaitu *Bacillus subtilis* menunjukkan fase stasioner dari kurva pertumbuhan pada kultur 96 jam (hari ke-4) dan *Bacillus licheniformis* pada kultur 72 jam (hari ke-3). Perbedaan terjadi karena antara spesies bakteri yang berbeda-beda memiliki waktu pertumbuhan untuk mencapai stasioner yang berbeda-beda, hal tersebut tergantung dengan kebutuhan nutrisi dan kemampuan membelah.

Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* pada hari ke-5 sampai ke-7 terjadi penurunan yang diperkirakan mulai masuk tahap kematian bakteri. Pertumbuhan bakteri baik dengan ketersediaan nutrisi yang mencukupi, hal ini akan mempengaruhi hasil produksi senyawa bioaktif yang lebih optimum. Penurunan terjadi karena adanya interaksi antara metabolit yang dihasilkan sebelum mencapai akhir fase stationer dengan metabolit yang dihasilkan setelah fase stasioner mampu mempengaruhi metabolit lainnya dan akan mempengaruhi hasil uji aktivitas antibakteri (Iqlima *et al.* 2017).

Perbedaan daya hambat antara isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* karena adanya perbedaan pertumbuhan antara spesies bakteri satu dengan lainnya, kemampuan bakteri berbeda-beda dalam berkembang biak. Kemampuan bakteri dalam menyesuaikan diri terhadap lingkungan serta kemampuan membelah diri dan bertahan hidup juga berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri. Imron & Purwanti (2016), perbedaan laju pertumbuhan antara bakteri yang satu dengan lainnya berbeda karena adanya pengaruh kandungan enzim yang terdapat pada bakteri berbeda sehingga

berpengaruh terhadap proses metabolisme serta dalam menghasilkan senyawa bioaktif (metabolit sekunder). Selain hal tersebut perbedaan dinding sel mempengaruhi daya hambat yang terbentuk antara isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Dinding sel bakteri Gram positif memiliki lapisan peptidoglikan lebih tebal dibandingkan dinding sel bakteri Gram negatif, sehingga kebutuhan akan nutrisi Gram positif akan lebih kompleks dibandingkan Gram negatif yang lebih sederhana (Lewis *et al.* 2007). Perlakuan dan media fermentasi yang sama antara isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* menyebabkan kebutuhan nutrisi isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* akan lebih besar daripada isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis*, sehingga menyebabkan daya hambat isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* yang dihasilkan lebih besar dibandingkan dengan isolat bakteri *Bacillus siamensis*. Hasil gambar aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* dapat dilihat pada lampiran 3.

Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* kemungkinan besar berasal dari tanah disekitar tanaman talas (*Colocasia esculenta* L.) dan masuk ke dalam tanaman talas melalui umbi talas (Strobel 2002). Hasil penelitian ini telah membuktikan bahwa isolat bakteri endofit umbi talas juga memiliki aktivitas antibakteri seperti ekstrak tanaman inangnya. Penelitian terkait aktivitas antibakteri umbi talas diantaranya yaitu berdasarkan skrining antibakteri ektrak etanol umbi talas (*Colocasia esculenta* L) dengan TLC- bioautografi menunjukan kandungan kimia alkaloid, dalam uji aktivitas antibakteri menunjukan hambatan terhadap bakteri *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typi*, *Shigella dysentriiae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans* dan *Vibrio Cholera* (Hibai 2015). Penelitian lainnya menyatakan hasil GC-MS dari umbi tanaman talas memiliki kandungan asam dekanoat, 10-fluoro trimetil ester dan asam pentadekanoat yang berpotensi sebagai antibakteri (Rosy & Rosakutty 2012), sedangkan untuk hasil uji antibakteri diketahui ekstrak umbi memiliki aktivitas terhadap bakteri *Pseudomonas aerugenosa*, *Serratia sp*, *Klebsiella sp*;

*Shigella sp; Escherichia coli; Staphylococcus aureus; Pseudomonas aeruginosa, Salmonella sp, Proteus mirabili dan Enterococcus sp* (Chakraborty *et al.* 2015).

Tinggi atau rendahnya aktivitas antibakteri disebabkan oleh sifat fisik senyawa yang dihasilkan, kemampuan menembus dinding sel, keutuhan molekul dalam sel serta sifat hidrofilik atau lipofiliknya (Sudana 2004). Menurut Ryan *et al.* (2008) beberapa bakteri endofit merupakan anggota bakteri penghuni tanah, seperti *Pseudomonas* dan *Bacillus* yang diketahui memiliki kemampuan menghasilkan senyawa bioaktif (metabolit sekunder) bersifat antibiotik, antikanker, antifungi, antivirus, insektisida dan immunosuppressant. Berdasarkan hal tersebut besar kemungkinan isolat bakteri endofit umbi talas memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa antibakteri yang sama dengan inangnya dan mentransformasikan menjadi struktur kimia lainnya sehingga diperlukan penelitian lanjutan untuk membuktikannya.

Hasil sintesis senyawa aktibakteri yang diperoleh dari isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* dapat diketahui protein yang digunakan sebagai senyawa antibakterinya melalui *Universal Protein Resource* (UniProt). UniProt digunakan untuk mengetahui informasi tentang fungsional biologis protein atau database urutan protein dari sekuensing genom. Bakteriosin adalah salah satu jenis protein antibakteri yang dihasilkan dari sintesis bakteri secara ribosomal dan bersifat bakterisidal terhadap bakteri lain yang mempunyai hubungan dekat dengan bakteri penghasilnya (Heng *et al.* 2007). Bakteriosin yang diproduksi oleh kelompok bakteri Gram negatif dibedakan menjadi 4 yaitu kolisin, *colicins like*, *phage-tail like* dan mikrosin (Chavan & Riley 2007). Genus bakteri *Bacillus sp* juga mampu mensintesis protein seperti gramicidin, tyrocidine, bacitracin, mycobacillin, surfaktin, bacilibactin, iturin A, fengycin, dan subtilin yang bersifat sebagai antimikroba (Mannanov & Sattarova 2001; Xu Ben-Hong *et al.* 2018).

Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* setelah dilakukan pencarian di UniProt diketahui dengan genus bakteri yang sama mampu mensintesis beberapa protein yang sebagai antibakteri karena terdapat proses biologis berupa transport bakteriosin seperti protein TonB, C-terminal dan Tol-Pal

system protein TolQ. Transport bakteriosin adalah proses pemindahan suatu molekul antimikroba yang melintasi membran plasma untuk masuk dan keluar sel, sehingga diduga protein melewati membran plasma untuk keluar sel dan memberikan efek penghambatan terhadap bakteri patogen (menyebabkan bakteri patogen lisis dan mati). Hasil yang diperoleh pada laman uniprot menjelaskan bahwa protein TonB, C-terminal memiliki similiaritas 90% dengan protein kolisin. Terdapat dua tipe kolisin berdasarkan cara membunuh bakteri yaitu kolisin pembentuk pori dan kolisin nuklease. Kolisin pembentuk pori bekerja membunuh target dengan membentuk pori dalam membran sel, sedangkan kolisin nuklease membunuh target dengan berperan sebagai DNAse, RNAse atau tRNAse (Gillor *et al.* 2004). Berdasarkan hal tersebut diketahui bahwa mekanisme protein TonB, C-terminal sama dengan protein kolisin sebagai antibakteri.

Isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* setelah dilakukan pencarian di UniProt diketahui dengan genus dan spesies yang sama mampu mensintesis protein bacteriocin, surfaktin dan iturin yang memiliki aktivitas antibakteri, penelitian Xu Ben-Hong *et al.* (2018) juga menyatakan bahwa bakteri *Bacillus siamensis* mampu mensintesis iturin A, bacilibactin, fengycin dan surfactin. Protein bakteriosin sama dengan kolisin yaitu membentuk pori dalam membran sitoplasma atau penghambatan biosintesis dinding sel dan aktivitas enzim (DNAse atau RNAse) dalam sel target (Chotiah 2013). Ekspresi gen adalah rangkaian proses penerjemahan informasi genetik dalam bentuk urutan basa DNA atau RNA menjadi protein, mekanisme antibakteri dengan adanya aktivitas DNAse atau RNAse akan mempengaruhi ekspresi gen. Proses ekspresi gen yang terganggu menyebabkan bakteri tidak memiliki kemampuan diferensial sel dan proses metabolisme dalam sel bakteri akan terganggu sehingga menyebabkan bakteri lisis dan mati. Mekanisme antibakteri surfaktin yaitu sifatnya yang amfifilik menjadikan molekul surfaktin berpenetrasi ke dalam membran sel target dan mempengaruhi permeabilitas selektif membran sel bakteri serta mengakibatkan kebocoran (Carillo *et al.* 2003). Begitu pula Michel *et al.* 1985 menyatakan mekanisme aksi antibakteri dari iturin adalah dengan membentuk pori pada membran sel. Membran sel bakteri berfungsi melindungi bagian molekuler sel

seperti sitoplasma dan mengatur zat yang berada dalam sel dengan zat yang berada di luar sel, adanya kerusakan pada membran sel akan menyebabkan keluarnya komponen penting dalam sel bakteri seperti protein, asam nukleat, nukleotida dan garam-garam mineral lainnya yang mengakibatkan bakteri menjadi lisis dan mati. Gambar hasil pencarian protein antibakteri isolat bakteri endofit dapat di lihat dalam lampiran 9 dan 10.

Hasil uji aktivitas antibakteri isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* terhadap *Escherichia coli* ATCC 25922 dilanalisis dengan SPSS 24. Uji statistik *Shapiro Wilk* bertujuan untuk mengetahui normalitas data. Berdasarkan data statistik diperoleh data *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* terdistribusi normal. Setelah data dinyatakan normal, selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian data. Isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* menunjukkan data tersebut tidak homogen. Data diolah dengan *One Way Anova* dan uji *Duncan* untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Berdasarkan data *Pseudomonas knackmussii* hasil fermentasi hari ke-2 sampai hari ke-7 diperoleh data yang menunjukkan tidak adanya perbedaan yang signifikan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Begitu pula dengan isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis* berdasarkan data hasil fermentasi hari ke-5 tidak terdapat perbedaan signifikan dengan fermentasi isolat bakteri endofit hari ke-3, ke-4, ke-6 dan ke-7, namun berbeda signifikan terhadap fermentasi hari ke-2 dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. . Hasil data analisis dapat dilihat pada lampiran 7 dan 8.

*Two Way Anova* digunakan untuk mengetahui perbedaan antara isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* terhadap waktu fermentasi dan diameter daya hambat yang dihasilkan. Berdasarkan data statistik dengan uji *Shapiro Wilk* diperoleh data yang terdistribusi normal. Setelah dinyatakan normal selanjutnya dilakukan uji homogenitas varian, diperoleh hasil data yang homogen antara kelompok isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii*, isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis*, waktu fermentasi, dan

isolat bakteri endofit terhadap waktu fermentasi dengan melihat variabel diameter daya hambatnya. Berdasarkan hasil uji *Duncan* dilakukan untuk mengetahui perbedaan pada masing-masing kelompok perlakuan dalam menghambat pertumbuhan *Escherichia coli*. Hasil uji yang diperoleh yaitu dari kontrol negatif, kontrol positif, isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* menunjukkan 4 subset yang berbeda. Subset 1 kontrol negatif berbeda dengan kontrol positif, isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis*. Subset 2 dan 3 menunjukkan isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* dan *Bacillus siamensis* menunjukkan aktivitas antibakteri tidak lebih besar dari kontrol positif, namun isolat bakteri endofit *Pseudomonas knackmussii* menunjukkan aktivitas lebih besar dari isolat bakteri endofit *Bacillus siamensis*. Hasil data analisis dapat dilihat pada lampiran 9.